

# Teràpia adenoviral en el càncer de pròstata

UAB  
Triball de final de grau 2013  
Grau en microbiologia  
Josep Sala Raduà

## 1. INTRODUCCIÓ:

El càncer de pròstata és el tumor maligne més freqüent i la segona causa principal de mort per càncer en homes en societats occidentals<sup>1</sup>. Els millors tractaments disponibles comporten la regressió del tumor així com la millora dels símptomes clínics. Ara bé en l'actualitat, no hi ha cap tractament eficaç disponible pels casos avançats<sup>2</sup>. És en els casos avançats on la teràpia gènica amb **adenovirus** brinda l'oportunitat d'obtenir una eina alternativa de lluita. A diferència de les teràpies tradicionals, aquesta pot ser dissenyada i adaptada utilitzant els coneixements de la malaltia a nivell molecular, la qual cosa ens permet fer un tractament més específic i efectiu sobre aquests càncers<sup>3</sup>. A dia d'avui la majoria d'estudis d'aquesta temàtica van enfocats a crear i modificar vectors adenovirals, per tal que aquests siguin més eficients a l'hora de reactivar gens amb efecte antitumoral<sup>4</sup>. En el cas concret del càncer de pròstata, els esforços van enfocats sobretot en aconseguir la reactivació del gen *PTEN*, la presència o absència del qual resulta crucial en la progressió d'aquest càncer<sup>2</sup>.

## 2. L'OBJECTIU DE GENERAR UN VECTOR ADENOVIRAL, ONCOLÍTIC, REPLICATIU I ESPECÍFIC AMB EFECTE ANTITUMORAL EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA

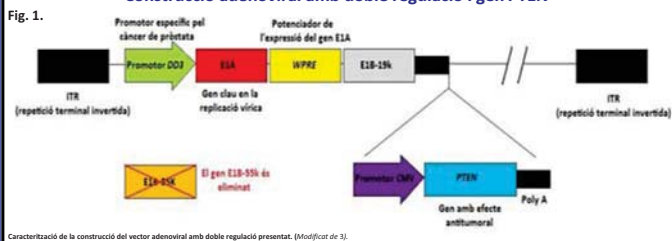
Per aconseguir un vector adenoviral eficaç, es treballa en base un adenovirus *wild-type* i sobre aquest es fan diverses modificacions per aconseguir un vector que compleixi l'objectiu. A l'hora de treballar amb adenovirus en teràpia gènica contra el càncer, es vol que aquest tingui una replicació eficient amb un alt nivell d'expressió del gen terapèutic<sup>4</sup>. A més, és absolutament necessari que la replicació del vector sigui específica del càncer a tractar. És clau que el vector compleixi els dos factors anteriors per fer l'efecte desitjat. Hi ha una àmplia varietat d'opcions per tal d'aconseguir-los. Ara bé, en els estudis més recents en càncer de pròstata es segueixen dues estratègies:

- La primera estratègia és eliminar un element viral el qual és necessari per a la replicació del virus en cèl·lules normals. Un gen comunament delectat és el **E1B-55k**. És prescindible en cèl·lules canceroses degut a la compensació de mecanismes<sup>5</sup>. Sense E1B-55k el virus no pot replicar-se en totes aquelles cèl·lules amb p53 normal, de manera que el vector adenoviral només es podrà replicar en les cèl·lules tumorals, les quals tenen p53 alterada.

- La segona estratègia consisteix en reemplaçar el promotor d'un gen clau en la replicació de l'adenovirus per un promotor específic del tumor. Concretament es treballa amb el promotor **DD3** altament específic del càncer de pròstata, i sota el seu control té el gen **E1A**, que té funcions com activar la transcripció vírica, i unir-se a supressors de creixement cel·lular. Ara bé, estudis recents han demostrat que l'expressió del gen E1A sota el promotor **DD3** és insuficient. Per resoldre aquest tipus de problema s'utilitzen elements que augmentin l'expressió. Un recentment aplicat, i que fins ara mai s'havia utilitzat en teràpia amb adenovirus és **WPRE** (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element).

Solucionat l'aspecte de l'especificitat i replicació del vector, per últim falta inserir un gen amb efecte terapèutic. Un gen supressor de tumors que en els últims anys ha augmentat moltíssim el seu ús en viroteràpia contra el càncer de pròstata és el gen **PTEN**. Aquest s'insereix a la construcció amb un promotor de citomegalovirus que en regula l'expressió. D'aquesta manera s'obté un vector adenoviral amb doble regulació contra el càncer de pròstata (Fig. 1).

### Construcció adenoviral amb doble regulació i gen *PTEN*



## 3. RESULTATS MÉS RELLEVANTS:

### Citotoxicitat específica en càncer de pròstata *in vitro* mitjançant l'assaig MTT:

Els resultats mostren una citotoxicitat específica per part del vector adenoviral amb doble regulació presentat. Addicionalment, s'observa que la inserció del gen *PTEN* provoca l'efecte antitumoral desitjat (Fig. 2).

### Inducció d'apoptosi en cèl·lules de càncer de pròstata *in vitro* mitjançant citometria de flux:

Respecte al vector presentat, els resultats indiquen que hi ha inducció d'apoptosi. A més es corrobora de nou que la inserció del gen *PTEN* fa l'efecte desitjat i l'especificitat del vector, al només actuar en línia cel·lular de càncer de pròstata (Fig. 3).

### Supressió del creixement tumoral induint apoptosi *in vivo*, en una línia cel·lular de càncer de pròstata injectada en ratolí:

S'observa que el creixement del tumor és nul després de l'administració del vector adenoviral amb doble regulació i el gen *PTEN*, inclús es redueix (Fig. 4A). Alhora amb qPCR es quantifica el contingut de vector en tumor durant el procés (Fig. 4B).

Fig. 2.

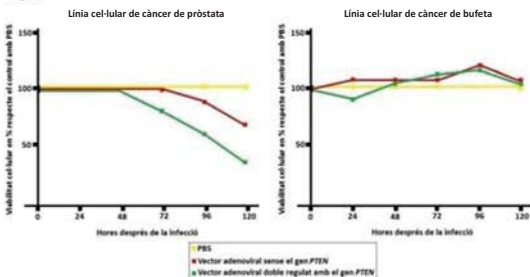


Fig. 2. Resultats de l'assaig MTT. Es veu la citotoxicitat específica del vector adenoviral amb doble regulació, en comparació al mateix vector sense el gen *PTEN*, en línies cel·lulars de càncer de pròstata i càncer de bufeta. Com a control s'utilitza PBS (Phosphate Buffered Saline). La viabilitat cel·lular es mesura cada 24 hores després de la infecció dels vectors en les línies cel·lulars. Figura 2. Modificat de [31].

Fig. 3.

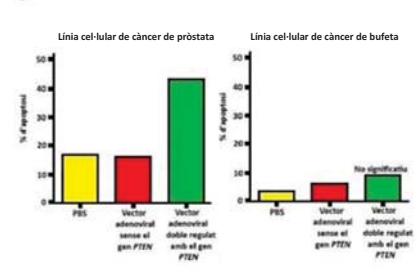


Fig. 3. Resultats de l'assaig de citometria de flux. Es veu la citotoxicitat específica del vector adenoviral amb doble regulació, en comparació al mateix vector sense el gen *PTEN*, en línies cel·lulars de càncer de pròstata i càncer de bufeta. Com a control s'utilitza PBS. Figura 3. Modificat de [31].

Fig. 4.

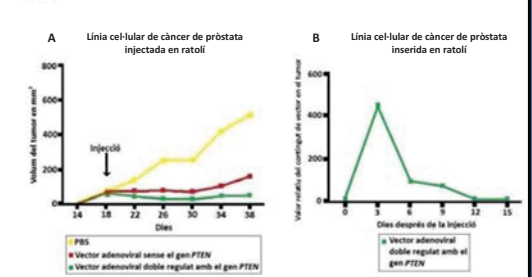


Fig. 4A. Resultats de l'efecte antitumoral del vector adenoviral amb doble regulació, en comparació al mateix vector sense el gen *PTEN*, en una línia cel·lular de càncer de pròstata injectada en ratolí. El volum del tumor es mesura en diversos dies després de la infecció. Com a control s'utilitza PBS. Fig. 4B. Resultats de la qPCR (quantificació real-time) per a la supressió del creixement tumoral induint apoptosi in vivo, en una línia cel·lular de càncer de pròstata injectada en ratolí. Es veu la reducció de la quantitat de DNA del vector adenoviral amb doble regulació amb el gen *PTEN*, en la línia cel·lular de càncer de pròstata injectada en ratolí. Els resultats mostren una disminució significativa del contingut de vector en el tumor durant el procés. Figura 4A, 4B. Modificat de [31].

## 4. VISIÓ ACTUAL SOBRE EL TEMA

- Molts dels promotors utilitzats són de tipus PSA. Aquests dependents de forma endògena d'andrògens. Per tant a l'hora d'augmentar l'especificitat del vector amb promotors, només es pot plantejar utilitzar-los en càncers de pròstata androgen independents. Pels càncers andrògen dependents, menys greus, encara no hi ha promotors específics eficaços.
- En estudis clínics s'aposta per intentar potenciar l'efecte mitjançant la combinació de diferents mètodes, ja que els nivells de mort cel·lular que causen els vectors adenovirals, no són comparables amb els d'altres estratègies contra el càncer.
- S'ha detectat que l'eficàcia de l'adenovirus amb el gen *PTEN*, varia segons la línia cel·lular que s'utilitzi. La raó no es coneix, però es creu que el vector té un major efecte citotòxic en cèl·lules on l'expressió de *PTEN* és negativa, que correspon amb els casos més greus de càncer de pròstata. Seria en aquests on hi hauria un major potencial terapèutic<sup>3</sup>.
- La replicació de l'adenovirus pateix una desacceleració, després de la injecció, però el tumor no creix de forma significativa<sup>6</sup>. Això està en estudi, es postula que les cèl·lules restants del tractament queden inhibides, tot i que la taxa de virus sigui molt baixa.

## 5. CONCLUSIONS:

- La viroteràpia en termes generals, ha passat d'entel·lequia a realitat.
- Encara queda molta feina a fer pel que fa a la comprensió de molts mecanismes a nivell molecular. També en disminuir els efectes tòxics que pot tenir sobre el pacient, així com la millora de models per obtenir millors resultats. I sobretot predir els efectes a llarg termini.
- Les investigacions actuals van en la línia de modificar els vectors d'origen adenoviral per reduir la seva toxicitat i immunogenicitat, incrementar l'especificitat dels vectors, i controlar els nivells i la durada de l'expressió dels gens en les cèl·lules diana un cop transferits.
- La millor opció per a l'avanç de la teràpia gènica adenoviral pel càncer de pròstata, és la posada en marxa de protocols clínics on es combinin aspectes de teràpia prou contrastats a nivell preclínic amb altres modalitats de tractament contra el càncer.
- La teràpia gènica adenoviral en el càncer de pròstata, es pot trobar en la consecució dels seus millors èxits.

## 6. Referències:

1. Yu, Zhang, Y., et al. (2012). Comparison of prostate-specific promoters and the use of PIP-driven virotherapy for prostate cancer. *Journal of Virology*, 86(12), 4262-4272.
2. Nicholson, TM, Hicks, WA, et al. (2011). Androgens and estrogen in benign prostate hyperplasia: past, present and future. *Differentiation* 82: 284-299.
3. Ding, M., Cao, X., et al. (2012). Prostate cancer-specific and potent antitumor effect of a DMSO-controlled oncolytic virus harboring the PTEN gene. *PLoS one*, 7(4), e35233.
4. Kim, SL, et al. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. Washington: ASM Press, 2005. 823 pages. ISBN 0-510-01272-2.
5. Zhang, Z., Bao, W., et al. (2008). An oncolytic adenovirus system: 2005 gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Res* 18: 447-458.
6. Xu, H., Huang, W., et al. (2012). HCC125, HCC127, HCC128, HCC129, HCC131, HCC132, HCC133, HCC134, HCC135, HCC136, HCC137, HCC138, HCC139, HCC140, HCC141, HCC142, HCC143, HCC144, HCC145, HCC146, HCC147, HCC148, HCC149, HCC150, HCC151, HCC152, HCC153, HCC154, HCC155, HCC156, HCC157, HCC158, HCC159, HCC160, HCC161, HCC162, HCC163, HCC164, HCC165, HCC166, HCC167, HCC168, HCC169, HCC170, HCC171, HCC172, HCC173, HCC174, HCC175, HCC176, HCC177, HCC178, HCC179, HCC180, HCC181, HCC182, HCC183, HCC184, HCC185, HCC186, HCC187, HCC188, HCC189, HCC190, HCC191, HCC192, HCC193, HCC194, HCC195, HCC196, HCC197, HCC198, HCC199, HCC200, HCC201, HCC202, HCC203, HCC204, HCC205, HCC206, HCC207, HCC208, HCC209, HCC210, HCC211, HCC212, HCC213, HCC214, HCC215, HCC216, HCC217, HCC218, HCC219, HCC220, HCC221, HCC222, HCC223, HCC224, HCC225, HCC226, HCC227, HCC228, HCC229, HCC230, HCC231, HCC232, HCC233, HCC234, HCC235, HCC236, HCC237, HCC238, HCC239, HCC240, HCC241, HCC242, HCC243, HCC244, HCC245, HCC246, HCC247, HCC248, HCC249, HCC250, HCC251, HCC252, HCC253, HCC254, HCC255, HCC256, HCC257, HCC258, HCC259, HCC260, HCC261, HCC262, HCC263, HCC264, HCC265, HCC266, HCC267, HCC268, HCC269, HCC270, HCC271, HCC272, HCC273, HCC274, HCC275, HCC276, HCC277, HCC278, HCC279, HCC280, HCC281, HCC282, HCC283, HCC284, HCC285, HCC286, HCC287, HCC288, HCC289, HCC290, HCC291, HCC292, HCC293, HCC294, HCC295, HCC296, HCC297, HCC298, HCC299, HCC300, HCC301, HCC302, HCC303, HCC304, HCC305, HCC306, HCC307, HCC308, HCC309, HCC310, HCC311, HCC312, HCC313, HCC314, HCC315, HCC316, HCC317, HCC318, HCC319, HCC320, HCC321, HCC322, HCC323, HCC324, HCC325, HCC326, HCC327, HCC328, HCC329, HCC330, HCC331, HCC332, HCC333, HCC334, HCC335, HCC336, HCC337, HCC338, HCC339, HCC340, HCC341, HCC342, HCC343, HCC344, HCC345, HCC346, HCC347, HCC348, HCC349, HCC350, HCC351, HCC352, HCC353, HCC354, HCC355, HCC356, HCC357, HCC358, HCC359, HCC360, HCC361, HCC362, HCC363, HCC364, HCC365, HCC366, HCC367, HCC368, HCC369, HCC370, HCC371, HCC372, HCC373, HCC374, HCC375, HCC376, HCC377, HCC378, HCC379, HCC380, HCC381, HCC382, HCC383, HCC384, HCC385, HCC386, HCC387, HCC388, HCC389, HCC390, HCC391, HCC392, HCC393, HCC394, HCC395, HCC396, HCC397, HCC398, HCC399, HCC400, HCC401, HCC402, HCC403, HCC404, HCC405, HCC406, HCC407, HCC408, HCC409, HCC410, HCC411, HCC412, HCC413, HCC414, HCC415, HCC416, HCC417, HCC418, HCC419, HCC420, HCC421, HCC422, HCC423, HCC424, HCC425, HCC426, HCC427, HCC428, HCC429, HCC430, HCC431, HCC432, HCC433, HCC434, HCC435, HCC436, HCC437, HCC438, HCC439, HCC440, HCC441, HCC442, HCC443, HCC444, HCC445, HCC446, HCC447, HCC448, HCC449, HCC450, HCC451, HCC452, HCC453, HCC454, HCC455, HCC456, HCC457, HCC458, HCC459, HCC460, HCC461, HCC462, HCC463, HCC464, HCC465, HCC466, HCC467, HCC468, HCC469, HCC470, HCC471, HCC472, HCC473, HCC474, HCC475, HCC476, HCC477, HCC478, HCC479, HCC480, HCC481, HCC482, HCC483, HCC484, HCC485, HCC486, HCC487, HCC488, HCC489, HCC490, HCC491, HCC492, HCC493, HCC494, HCC495, HCC496, HCC497, HCC498, HCC499, HCC500, HCC501, HCC502, HCC503, HCC504, HCC505, HCC506, HCC507, HCC508, HCC509, HCC510, HCC511, HCC512, HCC513, HCC514, HCC515, HCC516, HCC517, HCC518, HCC519, HCC520, HCC521, HCC522, HCC523, HCC524, HCC525, HCC526, HCC527, HCC528, HCC529, HCC530, HCC531, HCC532, HCC533, HCC534, HCC535, HCC536, HCC537, HCC538, HCC539, HCC540, HCC541, HCC542, HCC543, HCC544, HCC545, HCC546, HCC547, HCC548, HCC549, HCC550, HCC551, HCC552, HCC553, HCC554, HCC555, HCC556, HCC557, HCC558, HCC559, HCC560, HCC561, HCC562, HCC563, HCC564, HCC565, HCC566, HCC567, HCC568, HCC569, HCC570, HCC571, HCC572, HCC573, HCC574, HCC575, HCC576, HCC577, HCC578, HCC579, HCC580, HCC581, HCC582, HCC583, HCC584, HCC585, HCC586, HCC587, HCC588, HCC589, HCC590, HCC591, HCC592, HCC593, HCC594, HCC595, HCC596, HCC597, HCC598, HCC599, HCC600, HCC601, HCC602, HCC603, HCC604, HCC605, HCC606, HCC607, HCC608, HCC609, HCC610, HCC611, HCC612, HCC613, HCC614, HCC615, HCC616, HCC617, HCC618, HCC619, HCC620, HCC621, HCC622, HCC623, HCC624, HCC625, HCC626, HCC627, HCC628, HCC629, HCC630, HCC631, HCC632, HCC633, HCC634, HCC635, HCC636, HCC637, HCC638, HCC639, HCC640, HCC641, HCC642, HCC643, HCC644, HCC645, HCC646, HCC647, HCC648, HCC649, HCC650, HCC651, HCC652, HCC653, HCC654, HCC655, HCC656, HCC657, HCC658, HCC659, HCC660, HCC661, HCC662, HCC663, HCC664, HCC665, HCC666, HCC667, HCC668, HCC669, HCC670, HCC671, HCC672, HCC673, HCC674, HCC675, HCC676, HCC677, HCC678, HCC679, HCC680, HCC681, HCC682, HCC683, HCC684, HCC685, HCC686, HCC687, HCC688, HCC689, HCC690, HCC691, HCC692, HCC693, HCC694, HCC695, HCC696, HCC697, HCC698, HCC699, HCC700, HCC701, HCC702, HCC703, HCC704, HCC705, HCC706, HCC707, HCC708, HCC709, HCC710, HCC711, HCC712, HCC713, HCC714, HCC715, HCC716, HCC717, HCC718, HCC719, HCC720, HCC721, HCC722, HCC723, HCC724, HCC725, HCC726, HCC727, HCC728, HCC729, HCC730, HCC731, HCC732, HCC733, HCC734, HCC735, HCC736, HCC737, HCC738, HCC739, HCC740, HCC741, HCC742, HCC743, HCC744, HCC745, HCC746, HCC747, HCC748, HCC749, HCC750, HCC751, HCC752, HCC753, HCC754, HCC755, HCC756, HCC757, HCC758, HCC759, HCC760, HCC761, HCC762, HCC763, HCC764, HCC765, HCC766, HCC767, HCC768, HCC769, HCC770, HCC771, HCC772, HCC773, HCC774, HCC775, HCC776, HCC777, HCC778, HCC779, HCC780, HCC781, HCC782, HCC783, HCC784, HCC785, HCC786, HCC787, HCC788, HCC789, HCC790, HCC791, HCC792, HCC793, HCC794, HCC795, HCC796, HCC797, HCC798, HCC799, HCC800, HCC801, HCC802, HCC803, HCC804, HCC805, HCC806, HCC807, HCC808, HCC809, HCC810, HCC811, HCC812, HCC813, HCC814, HCC815, HCC816, HCC817, HCC818, HCC819, HCC820, HCC821, HCC822, HCC823, HCC824, HCC825, HCC826, HCC827, HCC828, HCC829, HCC830, HCC831, HCC832, HCC833, HCC834, HCC835, HCC836, HCC837, HCC838, HCC839, HCC840, HCC841, HCC842, HCC843, HCC844, HCC845, HCC846, HCC847, HCC848, HCC849, HCC850, HCC851, HCC852, HCC853, HCC854, HCC855, HCC856, HCC857, HCC858, HCC859, HCC860, HCC861, HCC862, HCC863, HCC864, HCC865, HCC866, HCC867, HCC868, HCC869, HCC870, HCC871, HCC872, HCC873, HCC874, HCC875, HCC876, HCC877, HCC878, HCC879, HCC880, HCC881, HCC882, HCC883, HCC884, HCC885, HCC886, HCC887, HCC888, HCC889, HCC890, HCC891, HCC892, HCC893, HCC894, HCC895, HCC896, HCC897, HCC898, HCC899, HCC900, HCC901, HCC902, HCC903, HCC904, HCC905, HCC906, HCC907, HCC908, HCC909, HCC910, HCC911, HCC912, HCC913, HCC914, HCC915, HCC916, HCC917, HCC918, HCC919, HCC920, HCC921, HCC922, HCC923, HCC924, HCC925, HCC926, HCC927, HCC928, HCC929, HCC930, HCC931, HCC932, HCC933, HCC934, HCC935, HCC936, HCC937, HCC938, HCC939, HCC940, HCC941, HCC942, HCC943, HCC944, HCC945, HCC946, HCC947, HCC948, HCC949, HCC950, HCC951, HCC952, HCC953, HCC954, HCC955, HCC956, HCC957, HCC958, HCC959, HCC960, HCC961, HCC962, HCC963, HCC964, HCC965, HCC966, HCC967, HCC968, HCC969, HCC970, HCC971, HCC972, HCC973, HCC974, HCC975, HCC976, HCC977, HCC978, HCC979, HCC980, HCC981, HCC982, HCC983, HCC984, HCC985, HCC986, HCC987, HCC988, HCC989, HCC990, HCC991, HCC992, HCC993, HCC994, HCC995, HCC996, HCC997, HCC998, HCC999, HCC1000, HCC1001, HCC1002, HCC1003, HCC1004, HCC1005, HCC1006, HCC1007, HCC1008, HCC1009, HCC1010, HCC1011, HCC1012, HCC1013, HCC1014, HCC1015, HCC1016, HCC1017, HCC1018, HCC1019, HCC1020, HCC1021, HCC1022, HCC1023, HCC1024, HCC1025, HCC1026, HCC1027, HCC1028, HCC1029, HCC1030, HCC1031, HCC1032, HCC1033, HCC1034, HCC1035, HCC1036, HCC1037, HCC1038, HCC1039, HCC1040, HCC1041, HCC1042, HCC1043, HCC1044, HCC1045, HCC1046, HCC1047, HCC1048, HCC1049, HCC1050, HCC1051, HCC1052, HCC1053, HCC1054, HCC1055, HCC1056, HCC1057, HCC1058, HCC1059, HCC1060, HCC1061, HCC1062, HCC1063, HCC1064, HCC1065, HCC1066, HCC1067, HCC1068, HCC1069, HCC1070, HCC1071, HCC1072, HCC1073, HCC1074, HCC1075, HCC1076, HCC1077, HCC1078, HCC1079, HCC1080, HCC1081, HCC1082, HCC1083, HCC1084, HCC1085, HCC1086, HCC1087, HCC1088, HCC1089, HCC1090, HCC1091, HCC1092, HCC1093, HCC1094, HCC1095, HCC1096, HCC1097, HCC1098, HCC1099, HCC1100, HCC1101, HCC1102, HCC1103, HCC1104, HCC1105, HCC1106, HCC1107, HCC1108, HCC1109, HCC1110, HCC1111, HCC1112, HCC1113, HCC1114, HCC1115, HCC1116, HCC1117, HCC1118, HCC1119, HCC1120, HCC1121, HCC1122, HCC1123, HCC1124, HCC1125, HCC1126, HCC1127, HCC1128, HCC1129, HCC1130, HCC1131, HCC1132, HCC1133, HCC1134, HCC1135, HCC1136, HCC1137, HCC1138, HCC1139, HCC1140, HCC1141, HCC1142, HCC1143, HCC1144, HCC1145, HCC1146, HCC1147, HCC1148, HCC1149, HCC1150, HCC1151, HCC1152, HCC1153, HCC1154, HCC1155, HCC1156, HCC1157, HCC1158, HCC1159, HCC1160, HCC1161, HCC1162, HCC1163, HCC1164, HCC1165, HCC1166, HCC1167, HCC1168, HCC1169, HCC1170, HCC1171, HCC1172, HCC1173, HCC1174, HCC1175, HCC1176, HCC1177, HCC1178, HCC1179, HCC1180, HCC1181, HCC1182, HCC1183, HCC1184, HCC1185, HCC1186, HCC1187, HCC1188, HCC1189, HCC1190, HCC1191, HCC1192, HCC1193, HCC1194, HCC1195, HCC1196, HCC1197, HCC1198, HCC1199, HCC1200, HCC1201, HCC1202, HCC1203, HCC1204, HCC1205, HCC1206, HCC1207, HCC1208, HCC1209, HCC1210, HCC1211, HCC1212, HCC1213, HCC1214, HCC1215, HCC1216, HCC1217, HCC1218, HCC1219, HCC1220, HCC1221, HCC1222, HCC1223, HCC1224, HCC1225, HCC1226, HCC1227, HCC1228, HCC1229, HCC1230, HCC1231, HCC1232, HCC1233, HCC1234, HCC1235, HCC1236, HCC1237, HCC1238, HCC1239, HCC1240, HCC1241, HCC1242, HCC1243, HCC1244, HCC1245, HCC1246, HCC1247, HCC1248, HCC1249, HCC1250, HCC1251, HCC1252, HCC1253, HCC1254, HCC1255, HCC1256, HCC1257, HCC1258, HCC1259, HCC1260, HCC1261, HCC1262, HCC1263, HCC1264, HCC1265, HCC1266, HCC1267, HCC1268, HCC1269, HCC1270, HCC1271, HCC1272, HCC1273, HCC1274, HCC1275, HCC1276, HCC1277, HCC1278, HCC1279, HCC1280, HCC1281, HCC1282, HCC1283, HCC1284, HCC1285, HCC1286, HCC1287, HCC1288, HCC1289, HCC1290, HCC1291, HCC1292, HCC1293, HCC1294, HCC1295, HCC1296, HCC1297, HCC1298, HCC1299, HCC1300, HCC1301, HCC1302, HCC1303, HCC1304, HCC1305, HCC1306, HCC1307, HCC1308, HCC1309, HCC1310, HCC1311, HCC1312, HCC1313, HCC1314, HCC